

Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava

Univerzitní studijní programy

Nanotechnologie

**Akutní akvatická toxicita nanočástic vybraných  
oxidů lanthanidů pro sladkovodní zelené řasy**

*Acute aquatic toxicity of selected nanoparticles  
based on lanthanides oxides to freshwater green algae*

**Autor:**

Lubomíra Kuzníková

**Vedoucí bakalářské práce:**

Mgr. Kateřina Dědková

Ostrava 2014

## Zadání bakalářské práce

Student:

**Ľubomíra Kuzníková**

Studijní program:

B3942 Nanotechnologie

Studijní obor:

3942R001 Nanotechnologie

Téma:

Akutní akvatická toxicita nanočástic vybraných oxidů lanthanidů pro  
sladkovodní zelené řasy  
Acute aquatic toxicity of selected nanoparticles based on lanthanides  
oxides to freshwater green algae

Zásady pro vypracování:

Cílem bakalářské práce je příprava a charakterizace nanomateriálů na bázi oxidů lanthanidů a hodnocení jejich akutní akvatické toxicity pro sladkovodní zelené řasy *Desmodesmus subspicatus*.

Práci bude tvořit:

1. Literární rešerše zabývající se problematikou akutní akvatické toxicity nanomateriálů na bázi kovů a jejich oxidů in vitro.
2. Laboratorní příprava nanočástic oxidů lanthanidů, jejich charakterizace vybranými analytickými metodami a hodnocení akvatické toxicity s použitím sladkovodní řasy *Desmodesmus subspicatus*.
3. Diskuse dosažených výsledků s ohledem na potenciální aplikace připravených materiálů.

The aim of the bachelor work is preparation, characterization and evaluation of acute aquatic toxicity of nanomaterials based on lanthanides oxides to freshwater green algae *Desmodesmus subspicatus*.

The work will have following parts:

1. Literature review dealing with acute aquatic toxicity of nanomaterials based on metals and their oxides in vitro.
2. Laboratory preparation of nanoparticles of lanthanides oxides, their characterization using selected analytical methods and evaluation of aquatic toxicity using freshwater green algae *Desmodesmus subspicatus*.
3. Discussion of achieved results in the respect of potential applications of prepared materials.

Seznam doporučené odborné literatury:

1. V.Kočí, K.Mocová: Ekotoxikologie pro chemiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2009, ISBN 978-80-7080-699-9.
2. P.Anděl: Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring, Evernia, 2011, ISBN 978-80-903787-9-7.
3. P.Williams: Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications, Wiley-Interscience, 2000, ISBN 9780471293217.
4. H.Greim: Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction, John Wiley & Sons, LTD, 2008, ISBN 978-0-470-86893-5.

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Kateřina Dědková**

Datum zadání: 21.10.2013

Datum odevzdání: 15.05.2014



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.  
*vedoucí katedry*



prof. Ing. Petr Noskievič, CSc.  
*prorektor pro studium*

### **Místopřísežné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vykonala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě dne 15. 5. 2014

.....

Kuzníková Ľubomíra

## Prohlášení o využití výsledků práce

Prohlašuji, že:

- jsem byla seznámena, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 – školní dílo.
- беру на ве́домі, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen „VŠB – TUO“) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§ 35 odst. 3).
- souhlasím s tím, že bakalářská práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB – TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o kvalifikační práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO.
- bylo sjednáno, že s VŠB – TUO v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.
- bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB - TUO, která je oprávněná v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB – TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- беру на ве́домі, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1988 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě dne 15. 5. 2014

.....

jméno a příjmení studenta

Ladislava Hosáka 1002/15 Ostrava 70030

adresa trvalého pobytu studenta



## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce Mgr. Kateřině Dědkové za analýzu vzorků na skenovacím elektronovém mikroskopu, za pomoc při testech akutní akvatické toxicity, ale i za všestranné vedení, odborný přístup, cenné rady a hlavně za ochotu a trpělivost, kterou se mnou měla. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Lubomírovi Pavelkovi za jeho vedení a pomoc při syntézách nanočástic oxidů lanthanidů a doc. Ing. Vlastimilu Matějkovi, Ph.D. za analýzu vzorků na práškovém difraktometru. Taktéž děkuji své rodině a nejbližším přátelům za jejich podporu.

Tato bakalářská práce byla vypracována s podporou projektu Nanotechnologie – báze pro mezinárodní spolupráci, reg. č. CZ.1.07/2.3.00/20.0074 podpořeného Operačním programem Vzdělávání pro konkurenceschopnost, financovaného ze strukturálních fondů EU a státního rozpočtu ČR.

## Abstrakt

Bakalářská práce pojednává o přípravě nanočástic oxidu ceričitého (nano CeO<sub>2</sub>) precipitační metodou z vybrané výchozí soli (Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O), z níž byl připravený vodný roztok o definované koncentraci srážen hydroxidem amonným. Vzniklé nanočástice byly charakterizovány práškovou rentgenovou difrakční analýzou, která prokázala, že precipitační metodou z vybrané výchozí soli lanthanidu se podařilo připravit oxid ceričitý. Morfologie nanočástic oxidu ceričitého byla zkoumána skenovacím elektronovým mikroskopem a elementární složení produktu bylo dále potvrzeno pomocí EDX analýzy. Nakonec byla testována akutní akvatická toxicita připravených nanočástic oxidu ceričitého, kdy jako detekční organismus byly použity zelené sladkovodní řasy *Desmodesmus subspicatus*.

*Klíčová slova:* akutní akvatická toxicita, řasy *Desmodesmus subspicatus*, nanočástice oxidu ceričitého

Vzor citace:

KUZNÍKOVÁ, Ľubomíra. *Akutní akvatická toxicita nanočástic vybraných oxidů lanthanidů pro sladkovodní zelené řasy*. Ostrava, 2014. 41 s. Bakalářská práce. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Mgr. Kateřina Dědková.

## Abstract

The bachelor thesis describes the preparation of cerium oxide nanoparticles (nano CeO<sub>2</sub>) via precipitation method from the selected default salt (Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O). The aqueous solution of defined concentration was prepared and precipitated with ammonium hydroxide. The resulting nanoparticles were characterized by powder X-ray diffraction analysis, which showed that the cerium oxide nanoparticles were successfully prepared by precipitation method from the selected default lanthanide salt. The morphology of cerium oxide nanoparticles was observed by scanning electron microscopy and the elemental composition of the product was confirmed by EDX analysis. At least, acute aquatic toxicity of prepared nanoparticles of cerium oxide was tested, when freshwater green algae *Desmodesmus subspicatus* served as a detection organism.

*Keywords:* acute aquatic toxicity, algae *Desmodesmus subspicatus*, cerium oxide nanoparticles

Reference format:

KUZNÍKOVÁ, Ľubomíra. *Acute aquatic toxicity of selected nanoparticles based on lanthanides oxides to freshwater green algae*. Ostrava, 2014. 41 p. Bachelor thesis. VŠB - Technical University of Ostrava. Supervisor Mgr. Kateřina Dědková.



## Seznam použitých značek a symbolů

$I_i$	inhibice růstu pro jednotlivé testované koncentrace
$\mu$	růstová rychlost řasové kultury pro jednotlivé testované koncentrace
$N$	hustota kultury v 1 ml
$V_0$	objem inokula
ECX	efektivní koncentrace pro $X$ -procentní účinek
LCX	letální koncentrace pro $X$ % jedinců
nano $CeO_2$	nanočástice oxidu ceričitého
EDX	energieově disperzní spektroskopie
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
XRD	rentgenová difrakční analýza
Ln	obecné označení lanthanidů
X	obecné označení halogenidů
ROS	reaktivní formy kyslíku
LDH	laktát dehydrogenáza
TP	celkové bílkoviny
ALP	alkalické fosfáty
MDA	malondialdehyd
GSH	glutathion
GSH-Px	glutathion peroxidáza

## Obsah

1.	Úvod.....	12
2.	Teoretická část .....	13
2.1.	Syntéza nanočástic CeO <sub>2</sub> .....	14
2.1.1.	Příprava nanočástic CeO <sub>2</sub> tepelným rozkladem .....	14
2.1.2.	Příprava nanočástic CeO <sub>2</sub> z chloridů vzácných zemin .....	15
2.1.3.	Příprava nanočástic CeO <sub>2</sub> mikrovlnným solvotermálním procesem... 15	
2.2.	Toxicita nanočástic CeO <sub>2</sub> a dalších lanthanidů .....	16
2.2.1.	Toxický účinek nanočástic CeO <sub>2</sub> na plicní tkáň.....	18
2.2.2.	Toxicita nanočástic CeO <sub>2</sub> vůči vodním organismům .....	19
2.2.3.	Toxicita nanočástic CeO <sub>2</sub> vůči bakteriím a kvasinkám.....	20
2.2.4.	Toxicita dalších lanthanidů .....	21
3.	Praktická část .....	23
3.1.	Testovaný materiál .....	23
3.1.1.	Přístrojové vybavení.....	23
3.1.2.	Syntéza nanočástic CeO <sub>2</sub> .....	23
3.2.	Charakterizace materiálů.....	24
3.3.	Akutní akvatická toxicita .....	24
3.3.1.	Detekční organismus .....	24
3.3.2.	Přístroje a pomůcky.....	25
3.3.3.	Princip počítání buněk v Bürkerově počítací komůrce .....	25
3.3.4.	Příprava živného roztoku.....	26
3.3.5.	Předkultivace řasové kultury .....	27
3.3.6.	Volba koncentrační řady a příprava testovaných vzorků .....	28
3.3.7.	Měření a podmínky inkubace .....	28
3.3.8.	Vyhodnocení testu a určení hodnoty EC50 .....	29
3.3.9.	Kritéria platnosti testu toxicity .....	30

4.	Výsledky a diskuze .....	31
4.1.	Charakterizace materiálu .....	31
4.2.	Akutní akvatická toxicita .....	33
5.	Závěr .....	35
	Reference .....	37

## 1. Úvod

Nanotechnologie není nová vědní disciplína, jedná se o interdisciplinární oblast výzkumu, která sdružuje vědní obory, jako jsou fyzika, kvantová mechanika, chemie, biochemie, elektronika atd. Nanotechnologie je obor, který vede k vývoji materiálů, zařízení a funkčních systémů s výjimečnými vlastnostmi, jež vyplývají z kvantové podstaty a schopnosti samoorganizace hmoty v rozměru nanometrů. Nanomateriály můžeme obecně definovat jako materiály, jejichž rozměry se pohybují v rozmezí 1-100 nm minimálně v jednom směru [1]. Nanomateriály v této velikosti mají rozdílné fyzikální, chemické a elektrické vlastnosti ve srovnání s materiály tradiční velikosti částic. Díky těmto jedinečným vlastnostem mohou být nanomateriály použity k vytvoření zcela nových produktů a aplikací a mohou být také začleněny do různých průmyslových procesů [2].

V současné době narůstající výroba a využití nanočástic pro různé průmyslové aplikace vyvolala otázky a obavy o jejich vliv na lidské zdraví [3]. Nanočástice oxidu ceričitého našly využití v řadě aplikací, jako jsou například opalovací krémy, venkovní nátěrové hmoty, výrobky pro péči o dřevo a dokonce se nanočástice oxidu ceričitého široce využívají v automobilovém průmyslu ke snížení emisí částic výfukových plynů [4, 5, 6]. Dále se nanočástice oxidu ceričitého využívají jako ultrafialové absorpční činidla, plynové senzory, kyslíkové pumpy, v solárních článcích, a také v hutních a sklo/keramických aplikacích [7].

Řada nedávných publikací ukázala, že expozice nanočástic oxidu ceričitého může mít nepříznivý účinek na lidské zdraví v důsledku tvorby reaktivních forem kyslíku, které vedou k oxidačnímu stresu, zánětu a následně mohou vést až k stresem indukované programované buněčné smrti. Naproti tomu však některé studie ukazují, že nanočástice oxidu ceričitého vykazují antioxidační vlastnosti, které podporují přežívání buněk v podmínkách oxidačního stresu [7] a proto se tedy nanočástice oxidu ceričitého mohou používat jako antioxidanty pro blokování enzymatické aktivity [8].

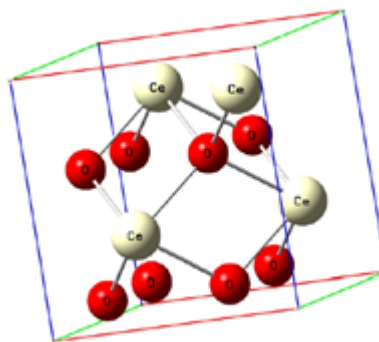
Cílem této bakalářské práce je příprava a charakterizace nanomateriálů na bázi oxidů lanthanidů a hodnocení jejich akutní akvatické toxicity pro sladkovodní zelené řasy *Desmodesmus subspicatus*.

## 2. Teoretická část

U vnitřně přechodných prvků, f-prvků, dochází k zaplňování orbitalů  $(n-2)f$ . Vnitřní orbitály f se zaplňují tak, že se podstatně nemění uspořádání poslední a předposlední sféry a vzhledem k tomu vykazují tyto prvky značnou podobnost, tedy vlastnosti těchto prvků jsou jen velmi málo odlišné i přesto, že se prvky liší svými protonovými čísly. Dle zaplňování orbitalů se f-prvky dělí na 4f a 5f prvky, kde prvky 4f se podobají lanthanu, proto se nazývají lanthanidy a následně prvky 5f se podobají aktiniu, proto se nazývají aktinidy [9].

Skupinu 14 prvků tvoří lanthanidy s protonovými čísly 58 až 71. Nejstabilnějším oxidačním číslem lanthanidů je III, kdy se stabilizační účinek připisuje rostoucímu náboji na orbitalech  $6s < 5d < 4f$  [9, 10]. Chemická podobnost lanthanidů souvisí s jejich společným oxidačním stavem III a s jejich téměř konstantními hodnotami elektronegativit. Lanthanidová kontrakce je příčinou nepatrných rozdílů chemických vlastností lanthanidů a její podstatou je odstiňující efekt elektronů 4f a následný vzrůst efektivního náboje jádra, proto iontové poloměry lanthanidů se s rostoucím protonovým číslem zmenšují [10]. Důsledkem lanthanidové kontrakce je pokles zásaditosti oxidů a snížení koordinačního čísla v komplexech [9].

Prvky skupiny lanthanidů se v zemské kůře vyskytují společně s prvky 3. skupiny a celá tato skupina se nazývá historickým názvem kovy vzácných zemin [9]. Tyto kovy nevytvářejí ložiska, ale jsou rozptýleny v rudách [11]. Lanthanidy jsou středně těžké stříbrolesklé kovy, kujné a tažné, mající malou pevnost v tahu a jejich tvrdost roste s rostoucím protonovým číslem. Dále jsou elektropozitivní, mají malou elektronegativitu (1,1 (Ce) – 1,3 (Lu)) a snadno se rozpouštějí v kyselinách za vzniku vodíku a tvorby solí  $\text{Ln}^{3+}$ . Za tepla lanthanidy vytvářejí s halovými prvky halogenidy  $\text{LnX}_3$ , s vodíkem hydridy  $\text{LnH}_2$  a  $\text{LnH}_3$ , přičemž s ostatními nekovy reagují méně ochotně. Při jejich zahřívání na teplotu 200 – 400 °C na vzduchu oxidují na  $\text{Ln}_2\text{O}_3$ , kromě ceru, který oxiduje na  $\text{CeO}_2$  [9]. Oxid ceričitý, krystaluje v kubické soustavě a je považován za nejdůležitější z oxidů vzácných zemin v důsledku jeho širokého aplikačního využití. Obr. 1 schematicky znázorňuje fluoritovou strukturu oxidu ceričitého [12].



Obr. 1: Struktura oxidu ceričitého [12].

Kovy vzácných zemin mají neobyčejné technické vlastnosti a proto se využívají zejména v metalurgii (zkujňování litiny, ochrana proti korozi), ve sklářství (optické vlastnosti), v keramickém průmyslu, elektrotechnice (magnetické materiály, luminofovy pro barevné televizní obrazovky, v laserech) a rovněž v chemickém průmyslu (katalyzátory např. pro výfukové plyny). Právě lanthanidy umožnily zmodernizovat metalurgický průmysl v USA, protože už 100 g směsi lanthanidů na jednu tunu litiny významně zlepší její vlastnosti [11].

## 2.1. Syntéza nanočástic $\text{CeO}_2$

Pro přípravu ultra jemných prášků a nanočástic oxidu ceričitého bylo vyvinuto mnoho metod, jako je homogenní precipitace, tepelný rozklad, spalovací metoda, mikroemulzní techniky, hydrotermální nebo glykoterminální krystalizace, sprejová pyrolýza, sol-gel, sonochemické metody a různé kombinace těchto metod [13, 14].

Při přípravě nanočástic je velmi důležitá volba metody, prekurzorů a reakčních podmínek, protože všechny tyto atributy ovlivňují vlastnosti připravených nanočástic, což má vliv na potenciální použití a aplikace takto připravených materiálů [13].

### 2.1.1. Příprava nanočástic $\text{CeO}_2$ tepelným rozkladem

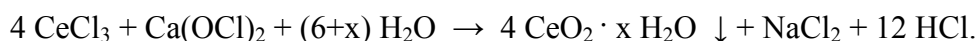
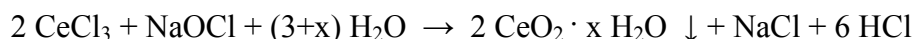
Nanočástice oxidu ceričitého mohou být připraveny s použitím krystalického propionátu hydrátu ceričitého jako prekurzoru, který se připravuje rozpuštěním uhličitanu ceričitého v propionové kyselině a následnou krystalizací. Hydrát uhličitanu ceričitého se rozpouští za míchání a zahřívání v mírném přebytku roztoku kyseliny propionové. Výsledná bílá suspenze se poté koncentruje odpařením a následně se ochladí na laboratorní teplotu. Po filtraci a sušení při teplotě 80 °C po dobu 10 hodin je

krystalický propionát ceru získán a následně je kalcinací přeměněn na oxid ceričitý při dané teplotě po dobu 90 minut [13].

Tato metoda přípravy nanočástic oxidu ceričitého je jednoduchá a ekonomicky proveditelná z důvodu použití krystalického prekursoru s nízkou molekulovou hmotností organokovové sloučeniny. Bylo zjištěno, že s nárůstem teploty kalcinace se primární částice oxidu ceričitého zmenšily a dosáhly ideálnějšího sférického tvaru. Jejich velikost se pohybovala v rozmezí 20 – 50 nm. [13].

### **2.1.2. Příprava nanočástic CeO<sub>2</sub> z chloridů vzácných zemin**

Oxidační srážení ceru je široce používána metoda pro separaci ceru z roztoků směsí chloridů vzácných zemin. Jako precipitát byl použit chlornan sodný a chlornan vápenatý, přičemž roztoky byly udržovány při teplotě 50 °C. Procesy přípravy probíhají dle následujících chemických rovnic:



Touto metodou lze připravit nanočástice oxidu ceričitého s fluoritovou strukturou o velikosti 2,4 – 6,9 nm [15].

### **2.1.3. Příprava nanočástic CeO<sub>2</sub> mikrovlnným solvotermálním procesem**

Mikrovlnné solvotermální metody mají velký potenciál pro přímou přípravu ultra jemných a vysoce čistých prášků. Mikrovlnný ohřev má ve srovnání s konvenčním, výhodu vysoké účinnosti a velmi rychlé tvorby nanočástic s úzkou distribucí velikosti a mírnou aglomerací. V poslední době jsou nanokrystalické částice oxidu ceričitého o velikosti 10 – 50 nm připravovány srážením z kovových dusičnanů s vodným roztokem hydroxidu draselného v průběhu 6 hodin za mírných solvotermálních podmínek (230 °C, 8 bar) a za použití ethylenglykolu jako rozpouštědla. Nanočástice oxidu ceričitého je rovněž možno připravit mikrovlnnou asistovanou topenářskou technikou z vybraných vodných roztoků Tímto tepelným zpracováním se připravují nanočástice oxidu ceričitého o velikosti 8 nm [14].

Nanokrystalické částice oxidu ceričitého lze také připravit mikrovlnnou asistovanou technikou za mírných podmínek teploty a tlaku z diethylglykolového roztoku obsahujícího dusičnan kovu a hexaminu jako srážecího činidla. Tedy



$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  se rozpustí v diethylglykolu a následně se do vodného roztoku přidá hexamin ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$ ) za intenzivního míchání, přičemž výsledná suspenze se umístí do reakční nádoby s dvojitou stěnou. Reakce se provádí za tlaku 10 kPa po dobu 60 minut v mikrovlnném reaktoru. Získaná disperze polyolů nanočástic oxidu ceričitého se sráží pomocí bezvodého acetonu a poté se nanočástice oddělí od roztoku odstředěním. Výsledná sraženina se promyje bezvodým acetonem několikanásobnou centrifugací a vysuší se ve vakuu při pokojové teplotě na světle žlutý prášek. Tepelná úprava prášku se provádí až do teplot 1100 °C [14].

Takto popsanou metodou se připravují nanočástice oxidu ceričitého o velikosti 3 nm s úzkou velikostní distribucí, kulovitou morfologií, s vysokým specifickým povrchem ( $180 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) a mikroporézní strukturou. Po tepelném zpracování dojde k zvýšení stupně krystalinity a posunu směrem k velikosti distribuce pórů v mesoporézní oblasti [14].

## 2.2. Toxicita nanočástic $\text{CeO}_2$ a dalších lanthanidů

Lidé mohou být vystaveni různým chemickým látkám prostřednictvím vody, ovzduší, potravin nebo dermatologickým působením. Vnější dávka, při které chemická látka způsobuje toxické účinky, je mírou její účinnosti [16]. Dávkou tedy chápeme množství látky, jež se dostane do organismu a je absorbováno [17]. Reakce na chemické látky závisí na délce a způsobu expozice, toxikokinetice chemické látky, vztahu dávka-odezva a vnímavosti jedince. Je nezbytné stanovit toxikologické profily pro každou chemickou látku, ať již existující nebo nově vyvinutou, aby došlo k ujištění, že její využití v průmyslových, nebo komerčně dostupných aplikacích je bezpečné [16].

Chceme-li získat dostatečné informace o nebezpečných vlastnostech látek je nutné šetření:

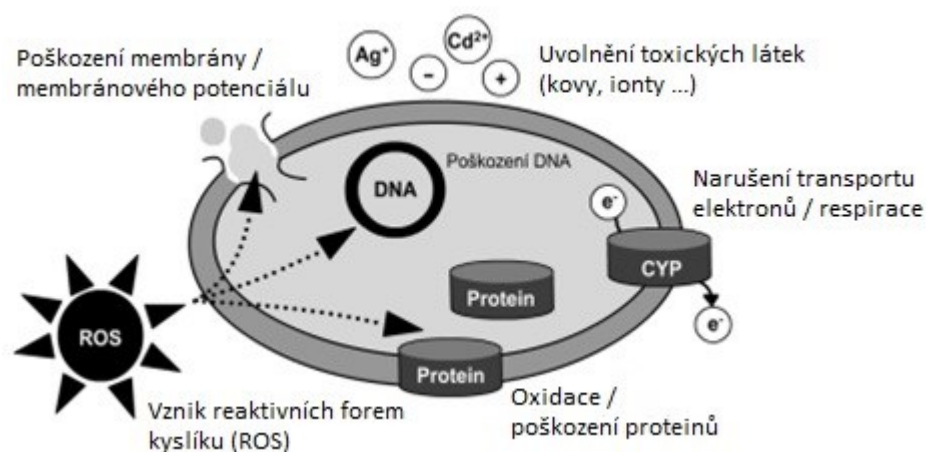
- akutní, subchronické a chronické toxicity (orální, inhalační, dermální);
- dráždivosti (kůže, sliznice, očí) a fototoxicity;
- senzibilizace a fotosenzitivity;
- genotoxicity (*in vitro* a *in vivo* metody);
- karcinogenity (celoživotní studie);
- reprodukční toxicity;

- toxikokinetiky;
- způsobu a mechanismu účinku [16].

Biotesty jsou nástrojem pro práci s živými organismy nebo organismálními systémy, které slouží k určení druhu a míry nepříznivého působení látek na testované organismy. Nejčastěji prováděnými biotesty jsou testy zaměřené na studování toxických účinků látek, ale používají se i jiné testy, jako jsou testy enzymatické aktivity, trofie apod. Testy toxicity mohou být provedeny v krátkém časovém intervalu, v tomto případě se jedná o akutní testy toxicity anebo v dlouhodobém časovém intervalu a to se pak jedná o chronické testy toxicity [18].

Toxicita je schopnost látky způsobit poškození organismu, přičemž různé látky jsou schopny toxicky působit různými mechanismy, tedy i jejich toxicita se může lišit. Toxicita dané látky je neměnná v čase a látka za daných podmínek buď toxická je, nebo není [18]. Toxikologie je věda, která se zabývá studiem nepříznivých účinků (toxicitou) chemických látek na živých organismech za určitých podmínek expozice [19]. Toxikologie je vědní disciplína, jejíž hlavním cílem je zjišťování nebezpečných vlastností látek a přípravků a stanovení preventivních opatření pro ochranu před jejich účinky [20].

Znalosti o toxicitě nanomateriálů jsou stále velmi omezené, i když toxické účinky již byly pozorovány zejména u nanočástic Ag, TiO<sub>2</sub>, ZnO, MgO, Ni, NiO, CeO<sub>2</sub>, kvantových teček a fullerenu. Testování toxicity se často soustředí na testy akutní akvatické toxicity, které jsou snadno proveditelné a jsou mezinárodně uznávány, přičemž mechanismy toxického účinku a faktory ovlivňující toxicitu doposud nebyly zcela objasněny. Nejčastěji toxicita nanomateriálů souvisí s poškozením membrán a vznikem nerovnováhy membránového potenciálu, s poškozením buněčných proteinů, s genotoxicitou, s narušením transportu elektronů v buňce, s vznikem reaktivních forem kyslíku a s uvolňováním toxických látek (Obr. 2) [21].



Obr. 2: Možné mechanismy účinků nanomateriálů [21].

Nejčastěji byla toxicita nanomateriálů testována na bakteriích (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), sladkovodních korýších (*Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*), sladkovodních řasách (*Desmodesmus subspicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlamydomonas reinhardtii*) a rybách. Při provádění testů toxicity se setkáváme s určitými problémy, jako jsou metody vhodné dispergace testovaných nanomateriálů, výběr vhodných referenčních látek a jejich následné použití a nakonec výběr vhodných metod testů toxicity [21].

### 2.2.1. Toxický účinek nanočástic CeO<sub>2</sub> na plicní tkáň

Nanočásticím oxidu ceriitého byly vystaveny lidské epiteliální buňky dýchacích cest, alveolární buněčná linie a myší fibroblasty. Bylo zjištěno, že studované nanočástice působící na použité buněčné modely, mají jen stěží akutní a subchronickou cytotoxicitu, a že nanočástice oxidu ceriitého nemají potenciál způsobit nežádoucí inhalační účinky na zdraví [3].

Naproti tomu následující studie hodnotí akutní toxický potenciál způsobený nanočásticemi oxidu ceriitého (velikost 55 nm) u krys, které byly vystaveny inhalaci aerosolu o koncentraci 641 mg·m<sup>-3</sup> nanočástic oxidu ceriitého. Bylo zjištěno:

- významné zvýšení celkového cholesterolu u samic potkanů v období 14 dnů po expozici;
- významný pokles životaschopnosti buněk u obou pohlaví ve všech testovaných časových bodech po expozici;
- významné zvýšení hodnot LDH (laktátu dehydrogenázy), TP (celkové bílkoviny) a ALP (alkalických fosfátů);

- zvýšení hladin zánětlivých cytokinů v krvi u kryš obou pohlaví po celou dobu expozice;
- nárůst obsahu MDA (malondialdehydu) v plicích kryš ve všech časových bodech testů;
- výrazné snížení obsahu GSH (glutathionu) v kryších plicích po 24 hod a 48 hod době expozice;
- významné zvýšení hladin antioxidačních enzymů GSH-Px (glutathionperoxidázy) po 24 hod a 48 hod expozici;
- výskytu nanočástic oxidu ceričitého v průduškách, průdušinkách, plicních sklípcích a plicní intersticii ve všech časových obdobích po expozici.

Z výše uvedeného plyne, že inhalační expozice nanočástic oxidu ceričitého může vyvolat cytotoxicitu prostřednictvím oxidačního stresu a může vést k chronické zánětlivé reakci plic bez ohledu na pohlaví kryš [7].

Další experimentální studie se zabývala tím, jak nanočástice oxidu ceričitého v kombinaci s výfukovými plyny mohou působit na dýchací cesty. Za použití epitelu dýchacích cest bylo zjištěno, že dochází k mechanické buněčné reakci, která rušivě ovlivňuje buněčné chování. [5].

### **2.2.2. Toxicita nanočástic CeO<sub>2</sub> vůči vodním organismům**

Testy s použitím korýšů *Daphnia magna* nebo ryb *Salmo gairdneri irideus* jsou běžně používané a mezinárodně uznávané pro hodnocení toxicity vody a odpadních vod. Testy akutní 48 hod toxicity nanočástic oxidu ceričitého s *Daphnia magna* bylo zjištěno, že jsou vysoce toxické, protože i při velmi nízkých koncentracích je inhibice růstu vyšší než 80 % a hodnota LC50 (letální koncentrace určující koncentraci toxikantu, při které uhynie 50 % testovaných jedinců [22]) je 0,012 mg·l<sup>-1</sup> [8].

V dalších studiích bylo pozorováno, že nanočástice oxidu ceričitého zpomalují růst korýšů *Daphnia magna* a zelených řas *Pseudokirchnerella subcapitata* [23] a dále bylo prokázáno, že sloučeniny ceru jsou schopny bioakumulovat se v játrech sladkovodních ryb *Danio rerio* [24].

V následující studii toxicity nanočástic oxidu ceričitého (o velikosti 2,1 nm a 47,7 nm) na zelených sladkovodních řasách *Desmodesmus subspicatus* bylo pozorováno, že:

- nanočástice oxidu ceričitého o velikosti 2,1 nm vykazují vyšší toxicitu než nanočástice o velikosti 47,7 nm;
- hodnoty střední efektivní koncentrace po 72 hod byly menší než po 168 hod;
- přidavkem surfaktantu došlo ke stabilizaci nanočástic a k intenzivnější interakci nanočástic s řasovou suspenzí, což mělo za následek projev většího inhibičního efektu na testovací organismus.

Ve výše uvedené studii došlo k prokázání, že velikost částic má vliv na toxicitu a je zde patrný synergický účinek surfaktantu a nanomateriálu [25].

### 2.2.3. Toxicita nanočástic CeO<sub>2</sub> vůči bakteriím a kvasinkám

V práci posuzující toxicitu nanočástic oxidu ceričitého vůči gram-negativní bakterii *Sinorhizobium meliloti*, žijící v symbióze s vojtěškou, bylo zjištěno, že nanočástice oxidu ceričitého jsou schopny inhibovat růst bakterie *Sinorhizobium meliloti* a že s nárůstem koncentrace nanočástic oxidu ceričitého dochází ke snížení životaschopnosti buněk [26].

V další studii byla zkoumána toxicita nanočástic oxidu ceričitého mikrodiluční metodou vůči patogenním bakteriím a minimální inhibiční koncentrace nanočástic oxidu ceričitého o průměrné velikosti částic 20 nm byly následující:

- 16 µg·ml<sup>-1</sup> vůči gram-negativní bakterii *Escherichia coli*;
- 8 µg·ml<sup>-1</sup> vůči gram-negativní bakterii *Salmonella typhimurium* a gram-pozitivní bakterii *Enterococcus faecalis*;
- 4 µg·ml<sup>-1</sup> vůči gram-pozitivní bakterii *Bacillus subtilis*.

Výsledky studie prokázaly, že nanočástice oxidu ceričitého se vyznačují antibakteriální aktivitou, což vede k jejich možnému využití jako antibakteriálních činidel [27].

Následující experimentální práce hodnotila cytotoxicitu nanočástic oxidu ceričitého o velikosti přibližně 50 nm vůči kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae*. Toxicita byla hodnocena metodou sledování spotřeby kyslíku v testovaných kulturách a analýzou integrity buněčné membrány. Při testech došlo k aglomeraci nanočástic oxidu ceričitého a proto bylo použito stabilizační polyakrylátové dispergační činidlo. Nanočástice oxidu ceričitého o koncentraci 1000 mg·l<sup>-1</sup> vykazovaly zvýšenou toxicitu (47 % na 1000 mg·l<sup>-1</sup>) pouze při použití stabilizačního

dispergačního činidla a nezpůsobovaly žádné významné narušení integrity membrány. Celkově získané výsledky ukazují, že nanočástice oxidu ceričitého vykazují pouze nízkou toxicitu vůči buňkám kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* [28].

Ve studii zabývající se toxicitou kompozitních nanovláken  $\text{Ce}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$  vůči gram-pozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* a gram-negativní bakterii *Salmonella typhimurium* byly stanoveny baktericidní účinky, na základě určení minimální inhibiční koncentrace nanovláken a analýzy pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Bylo zjištěno, že nejnižší koncentrace nanovláken  $\text{Ce}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$  způsobující inhibici růstu testovaných kmenů je  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Analýza transmisním elektronovým mikroskopem prokázala, že vystavení bakterií nanovláknům vede k narušení jejich buněčných stěn, což je důvod jejich smrti. Příčina poškození buněčné stěny se přičítá uvolněným kyslíkovým radikálům. Z výše uvedeného je zřejmé, že kompozitní nanovlákná  $\text{Ce}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$  jsou do budoucna slibnými kandidáty na materiály s baktericidními vlastnostmi nacházející uplatnění v potravinářském průmyslu [29].

#### 2.2.4. Toxicita dalších lanthanidů

O neodymu je známo, že vykazuje cytotoxické účinky a vyvolává apoptózu u některých nádorových buněk. Bylo pozorováno, že oxid neodymitý v nano měřítku je schopný způsobit masivní vakuolizace a buněčnou smrt u karcinomu plic buněk NCI-H460 v mikro molárním koncentračním rozmezí. Tohoto jevu by bylo možno v budoucnu využít k vývoji léku proti karcinomu plic [30].

U nanotyčinek hydroxidu europitého o velikosti 200 až 300 nm připravených mikrovlnnou technikou byla stanovována *in vivo* toxicita pomocí intraperitoneálních injekcí na myších. Bylo zjištěno, že:

- hematologie je normální s výjimkou zvýšených jaterních enzymů (jak u krátkodobých, tak u dlouhodobých testů toxicity);
- životně důležité orgány (játra, slezina, ledviny a plíce) nevykazovaly žádné nebo jen mírné histologické změny.

Z této experimentální studie je zřejmé, že nanotyčinky hydroxidu europitého o velikosti 200 až 300 nm způsobují mírnou nebo žádnou toxicitu a bylo prokázáno, že mají proangiogenní vlastnosti. Proto by bylo možné tohoto faktu v budoucnu využít při alternativní terapeutické léčbě závažných srdečních, periferních a končetinových ischemických chorob [31].

Lanthan i s jeho sloučeninami způsobuje nižší srážlivost krve a poškozuje játra, přičemž akutní toxicita je malá [32, 33]. Hepatotoxické účinky vykazuje také praseodym. O gadolinu bylo zjištěno, že je toxičtější než samarium. Terbium i jeho sloučeniny jsou také hepatotoxické, zpomalují růst, vyvolávají poruchy krevního oběhu a ochrnutí dýchacích cest. Toxikologicky podobné terbiu je dysprosium [33]. Komplexní sloučeniny lanthanidů (praseodym, neodým, samarium, erbium) vykazují antikoagulační vlastnosti, z čehož je zřejmé, že jsou schopny snižovat srážlivost krve [11]. Z předchozích tvrzení lze konstatovat, že toxické účinky lanthanidů jsou navzájem podobné a nejspíše akutní toxicita lanthanidů roste s jejich rostoucím protonovým číslem [33].



### 3. Praktická část

#### 3.1. Testovaný materiál

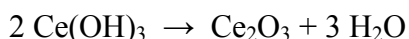
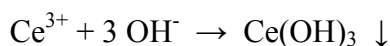
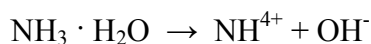
Byla testována akutní akvatická toxicita nanočástic oxidu ceričitého připravených precipitační metodou z vybrané výchozí soli lanthanidu.

##### 3.1.1. Přístrojové vybavení

- Analytické váhy Acculab (Antilon).
- Míchačka Heidolph MR 3003 control.
- pH metr Thermo Scientific.
- Ultrazvuk Bandelin Sonorex.
- Centrifuga Hettich Zentifugen EBA 12.
- Sušárna Memmert DO6836.
- Kalcinační pec LAC mikroTHERM825.

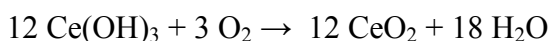
##### 3.1.2. Syntéza nanočástic CeO<sub>2</sub>

Nanočástice oxidu ceričitého byly připraveny precipitační metodou z vybrané výchozí soli. Připravený vodný roztok Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O o koncentraci 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> byl vytemperován na teplotu 25 °C a následně srážen hydroxidem amonným o koncentraci 0,04 mol·dm<sup>-3</sup>. Průběh přípravy nanočástic oxidu ceričitého zobrazuje následující reakční schéma:



Reakce probíhala za stálého míchání a teploty 25 °C po dobu (20 ± 4) hod. Vzniklý produkt byl následně odstředěn, vysušen při teplotě 150 °C a kalcinován při teplotě 600 °C po dobu 4 hodin.

Touto metodou vznikl žlutý prášek nanočástic oxidu ceričitého. Změna oxidačního stavu atomu Ce(III) na Ce(IV) je způsobena oxidací vzdušným kyslíkem (při sušení a kalcinaci), jelikož oxid ceričitý je stabilnějšího charakteru. Následující reakční schéma znázorňuje transformaci hydroxidu ceritého, získaného při srážení, kalcinací v peci.



### 3.2. Charakterizace materiálů

Pro studium fázového složení produktu byla využita prášková rentgenová difrakční analýza (XRD - Bruker D8 Advance). Metodou lze stanovit krystalické fáze v práškovém materiálu. Pro vyhodnocení difrakčních záznamů byl použit software DIFFRACplus BASIC (Bruker AXS). Pro identifikaci přítomných fází byla použita databáze PDF 2 Release 2004 (International Centre for Diffraction Data).

Velikost krystalitů byla vypočtena dle Scherrerovy rovnice [34]

$$L_c = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta}, \quad (1)$$

kde  $K$  je faktor mikrostruktury,  $\lambda$  je vlnová délka použitého záření dané lampy (Co-lampa),  $\beta$  je experimentální pološířka difrakce vzorku a  $\theta$  je poloha maxima difrakčního profilu.

Morfologie produktu byla pozorována skenovacím elektronovým mikroskopem Quanta FEG 450 (FEI) s EDS analyzátozem APOLLO X (EDAX).

### 3.3. Akutní akvatická toxicita

Testy akutní akvatické toxicity byly provedeny podle normy ČSN EN ISO 8692 [35] a směrnice OECD 201 [36]. Podstatou těchto testů bylo zjistit střední efektivní (účinnou) koncentraci EC50, což je koncentrace toxikantu, při níž se projeví 50 % účinek v porovnání s kontrolou [22].

#### 3.3.1. Detekční organismus

Jako detekční organismus byly pro testy toxicity použity sladkovodní zelené řasy *Desmodesmus subspicatus* (Obr. 3), které se taxonomicky řadí do Říše: Rostliny (*Plantae*), Podříše: Nižší rostliny (*Protobiota*), Oddělení: Zelené řasy (*Chlorophyta*), Třídy: Zelenivky (*Chlorophyceae*), Řádu: *Sphaeropleales* a Čeledi: *Scenedesmaceae* [37]. Řasa *Desmodesmus subspicatus* byla pořízena z Botanického ústavu Akademie věd ČR v Třeboni.



Obr. 3: Snímek buněk sladkovodní zelené řasy *Desmodesmus subspicatus* [38].

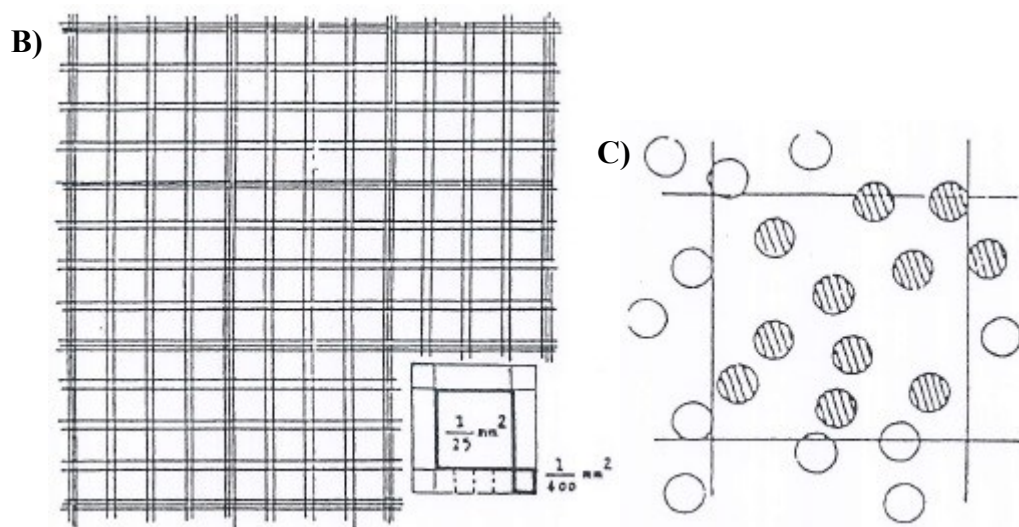
### 3.3.2. Přístroje a pomůcky

- Optický mikroskop Olympus CX31 s počítačí Bürkerovou komůrkou.
- Konduktometr Cond 315i (WTW) s vodivostní celou 325/C (Tetracon).
- pH metr pH 11 (Eurotech Instrumens).
- Třepačka HS 260 basic (IKA).
- Kultivační komora KBW 240 (Binder).
- Flow box Steril - BioBan 48 (Schoeller).
- Autokláv Sanyo Sterilizer MOV-112S (Schoeller).
- 250 ml Erlenmayerovy baňky se zátkami z buničité vaty, mikropipety, pipety s balónkem a odměrné baňky.

### 3.3.3. Princip počítání buněk v Bürkerově počítací komůrce

Počet buněk se stanovuje v Bürkerově počítací komůrce (Obr. 4 A), která obsahuje počítací mřížku (Obr. 4 B). Buňky se počítají v 50 velkých čtvercích, přičemž jich musí být napočítáno minimálně 400. Pokud je počet spočítaných buněk menší než 400, tak se buňky počítají ve 100 velkých čtvercích. Ve čtverci se počítají všechny buňky uvnitř čtverce a buňky, které se dotýkají zevnitř nebo zvenčí horní a pravé strany, ostatní buňky se nepočítají (Obr. 4 C).





Obr. 4: A) Snímek Bürkerovy počítací komůrky. B) Počítací mřížka Bürkerovy komůrky [35]. C) Schéma principu počítání buněk ve čtverci [35].

#### 3.3.4. Příprava živného roztoku

Zásobní roztoky se připravují dle tabulky 1, přičemž k jejich přípravě byla použita demineralizovaná voda a všechny uvedené chemikálie byly v analytické p.a. čistotě. Zásobní roztoky bez  $\text{NaHCO}_3$  byly sterilizovány v autoklávu při teplotě  $120^\circ\text{C}$  po dobu 15 minut. Roztok č. 4 ( $\text{NaHCO}_3$ ) se pouze filtroval přes membránový filtr.

Zásobní živný roztok se připravil do 1000 ml odměrné baňky smícháním 100 ml zásobního roztoku č. 1, 10 ml zásobního roztoku č. 2, 10 ml zásobního roztoku č. 3, 10 ml zásobního roztoku č. 4 a doplnil se destilovanou vodou po rysku. Standardní živný roztok se připravil desetinasobným zředěním zásobního živného roztoku, což znamená, že do 1000 ml odměrné baňky se odměřilo 100 ml zásobního živného roztoku a doplnila se destilovanou vodou po rysku.

Tabulka 1: Složení růstového média.

<b>Zásobní roztok č. 1:</b>	<b>Hmotnostní</b>
<b>živiny</b>	<b>koncentrace</b>
NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g·l <sup>-1</sup>
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,2 g·l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,8 g·l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,5 g·l <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,16 g·l <sup>-1</sup>
<b>Zásobní roztok č. 2:</b>	<b>Hmotnostní</b>
<b>Fe-EDTA</b>	<b>koncentrace</b>
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	80 mg·l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	100 mg·l <sup>-1</sup>
<b>Zásobní roztok č. 3:</b>	<b>Hmotnostní</b>
<b>stopové prvky</b>	<b>koncentrace</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185 mg·l <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	415 mg·l <sup>-1</sup>
ZnCl <sub>2</sub>	3 mg·l <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,5 mg·l <sup>-1</sup>
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,01 mg·l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	7 mg·l <sup>-1</sup>
<b>Zásobní roztok č. 4</b>	<b>Hmotnostní</b>
	<b>koncentrace</b>
NaHCO <sub>3</sub>	50 g·l <sup>-1</sup>

### 3.3.5. Předkultivace řasové kultury

Předkultivace probíhala za stejných podmínek jako u zkoušky. Růstové médium bylo inokulováno dostatečným počtem buněk tak, aby se udržel jejich exponenciální růst. Před zahájením předkultivace byl stanoven počet buněk v mililitru podle vztahu (2)

$$N = \frac{\text{celkový počet buněk}}{\text{počet čtverců}} \cdot 250 \cdot 1000, \quad (2)$$

kde 250 je objem na 1 čtverec a 1000 je přepočít na 1 ml.

Následně byl spočítán potřebný objem inokula  $V_0$ , který byl přidán ke zkoušeným a kontrolním vzorkům na počátku testu akutní toxicity podle vztahu (3)

$$V_0 = \frac{V \cdot c}{N}, \quad (3)$$

kde  $N$  je hustota inokulační kultury v 1 ml,  $V$  je množství testovaného roztoku, a  $c$  je požadovaná hustota řasové kultury na počátku testu. V našem případě je  $V = 100$  ml a  $c = 10000$  buněk $\cdot$ ml $^{-1}$ .

### 3.3.6. Volba koncentrační řady a příprava testovaných vzorků

Optimální koncentrační řada se připravuje tak, že má jednu koncentraci blízkou EC50 a koncentrace s nižší a vyšší odezvou jsou symetricky rozmístěné kolem této hodnoty [18]. Z důvodu nedostatku informací v dosud publikovaných vědeckých pracích, nebylo možno inspirovat se při volbě koncentrační řady dříve provedenými testy. Proto byl rozsah koncentrací stanoven na základě výsledků předběžného orientačního testu, který předcházel testu stanovujícího EC50. Pro nanočástice oxidu ceričitého byla určena následující koncentrační řada: 1 g $\cdot$ l $^{-1}$ ; 0,8 g $\cdot$ l $^{-1}$ ; 0,6 g $\cdot$ l $^{-1}$ ; 0,4 g $\cdot$ l $^{-1}$ ; 0,2 g $\cdot$ l $^{-1}$ .

Připravený roztok nanočástic oxidu ceričitého o koncentraci 1 g $\cdot$ l $^{-1}$  byl vystaven působení ultrazvuku po dobu 6 hodin, aby došlo k vytvoření suspenze o co největší možné disperzi částic v celém objemu. Takto připravený roztok se následně ředil na zvolené koncentrace.

Současně probíhaly vždy dva paralelní testy z důvodu validity testu. Pokud pH testovaných nebo kontrolních vzorků nespadalo do fyziologického rozmezí ( $8,3 \pm 0,2$ ), vzorky byly upraveny pomocí kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 1 mol $\cdot$ dm $^{-3}$  nebo hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol $\cdot$ dm $^{-3}$ .

### 3.3.7. Měření a podmínky inkubace

Všechny testované Erlenmayerovy baňky byly opatřeny zátkami z buničité vaty, která zamezuje kontaminaci a umožňuje přístup oxidu uhličitého do nádob, který je nezbytný pro růst řasové kultury. Inkubace probíhala v kultivační komoře při teplotě ( $23 \pm 2$ ) °C s kontinuálním osvětlením po dobu 24 hod. Během celé doby inkubace byly baňky třepány při ( $125 \pm 25$ ) rpm. Testy probíhaly po dobu ( $72 \pm 2$ ) hod a na konci zkoušky bylo změřeno pH všech testovaných vzorků.

### 3.3.8. Vyhodnocení testu a určení hodnoty EC50

Pro každý z paralelních testů se hodnota EC50 stanovuje zvlášť a výsledná hodnota je průměrem těchto hodnot. Variabilita výsledků by neměla přesáhnout 30 %.

Výpočet inhibice růstu je založen na porovnání růstových rychlostí  $\mu$  řasové kultury v testovaných vzorcích a v kontrole a počítá se dle vztahu (4)

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}, \quad (4)$$

kde  $N_n$  je hustota buněk naměřená na konci testů (počet buněk v 1 ml),  $N_0$  je hustota buněk na začátku testů (počet buněk v 1 ml) a  $t_n$  je doba trvání testů (dny). Z vypočítaných hodnot růstových rychlostí  $\mu$  pro každý testovaný vzorek a kontrolní vzorek se vypočítá inhibice  $I_i$  v % pro každou testovanou koncentraci dle následující rovnice (5)

$$I_i = \frac{(\mu_c - \mu_i) \cdot 100}{\mu_c}, \quad (5)$$

kde  $I_i$  je inhibice (popřípadě stimulace, pokud je  $I_i < 0$ ) pro danou koncentraci,  $\mu_i$  je růstová rychlost řasové kultury v testované koncentraci a  $\mu_c$  je růstová rychlost řasové kultury v kontrole.

Hodnota EC50 se stanovuje následovně:

- koncentrace látky, při níž došlo k inhibici růstu, se vyjádří v logaritmických hodnotách;
- sestaví se tabulka hodnot  $I_i$  proti odpovídajícím koncentracím testované látky;
- hodnoty tabulky se vynesou do souřadnicového systému, kde na ose  $x$  se nachází dekadický logaritmus koncentrace testované látky  $\log c$  a na ose  $y$  se nachází inhibice růstu  $I_i$ ;
- metodou nejmenších čtverců se získanými body proloží přímka;
- z průsečíku proložení přímky a souřadnice 50 % inhibice se spustí kolmice na osu  $x$  a odečte se hodnota  $\log EC50$ ;
- odlogaritmováním hodnoty  $\log EC50$  se získá hledaná hodnota EC50.



### **3.3.9. Kritéria platnosti testu toxicity**

Výsledky testu jsou platné, jen zda jsou splněna následující kritéria:

- hustota buněk se u kontrolních vzorků po 72 hod testů musí zvýšit minimálně 16 krát;
- hodnota pH se u všech vzorků nesmí změnit o více než o 1,5 jednotky v porovnání naměřených hodnot pH na počátku a na konci testu.

## 4. Výsledky a diskuze

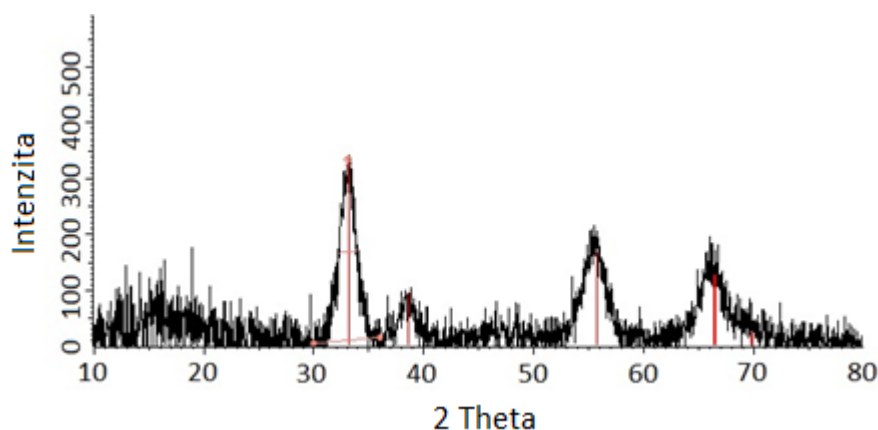
### 4.1. Charakterizace materiálu

Precipitační metodou z vybrané výchozí soli lanthanidu byl připraven světle žlutý prášek nanočástic oxidu ceričitého (Obr. 5).



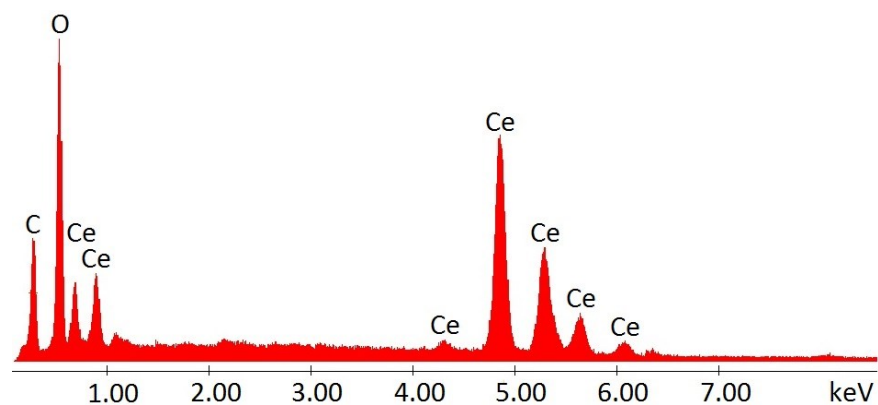
Obr. 5: Ilustrační fotografie produktu precipitační syntézy.

Z experimentálních dat difrakční analýzy (Obr. 6) je zřejmé, že zvolenou metodou syntézy se podařilo připravit oxid ceričitý. Podle Scherrerovy rovnice byla určena velikost krystalitů připravených nanočástic 58 nm.



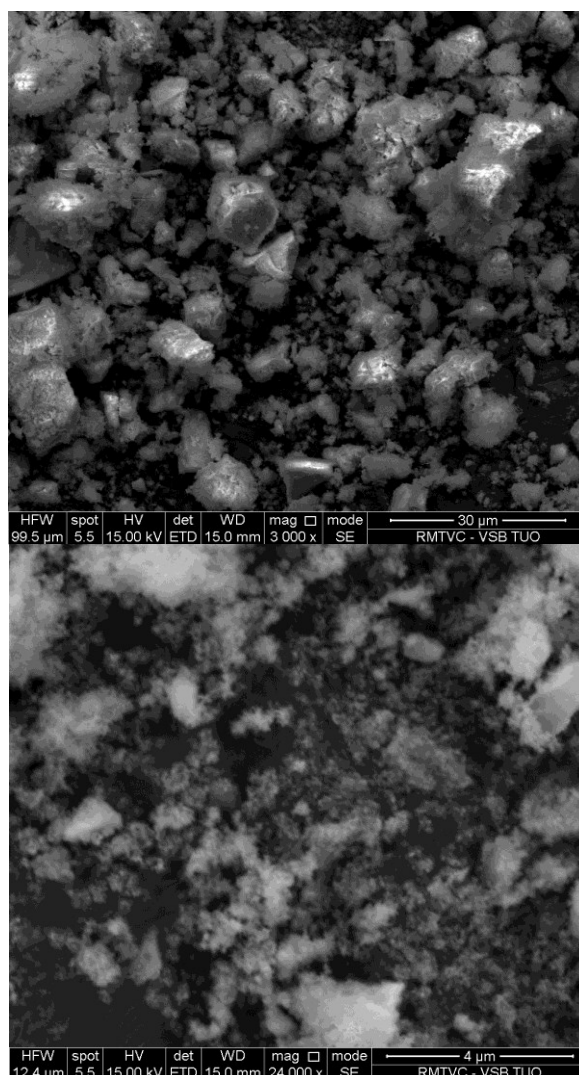
Obr. 6: Záznam difrakčního spektra produktu precipitační syntézy.

EDX (Obr. 7) analýza potvrdila přítomnost ceru a kyslíku. Uhlík přítomný v EDX záznamu pochází z uhlíkové pásky, na níž byl vzorek nanesen a následně naprášen Au/Pd vrstvičkou.



Obr. 7: EDX záznam analyzovaného vzorku.

Z fotografií pořízených na skenovacím elektronovém mikroskopu v režimu sekundárních elektronů (Obr. 8) je patrné, že během přípravy došlo k aglomeraci připravených nanočástic.



Obr. 8: Snímky vzorku ze skenovacího elektronového mikroskopu pořízených při různém zvětšení.

#### 4.2. Akutní akvatická toxicita

V tabulce 2 jsou uvedeny naměřené hodnoty pH a vodivosti testovaných vzorků před jejich naočkováním kulturou na počátku testu a naměřené hodnoty pH po skončení testu toxicity. Z naměřených hodnot vodivosti je patrné, že vodivost vzorků s klesající koncentrací mírně klesá. A u naměřených hodnot pH je zřejmé, že se u všech vzorků jeho hodnota nezměnila o více než 1,5 jednotky, což svědčí o platnosti testu.

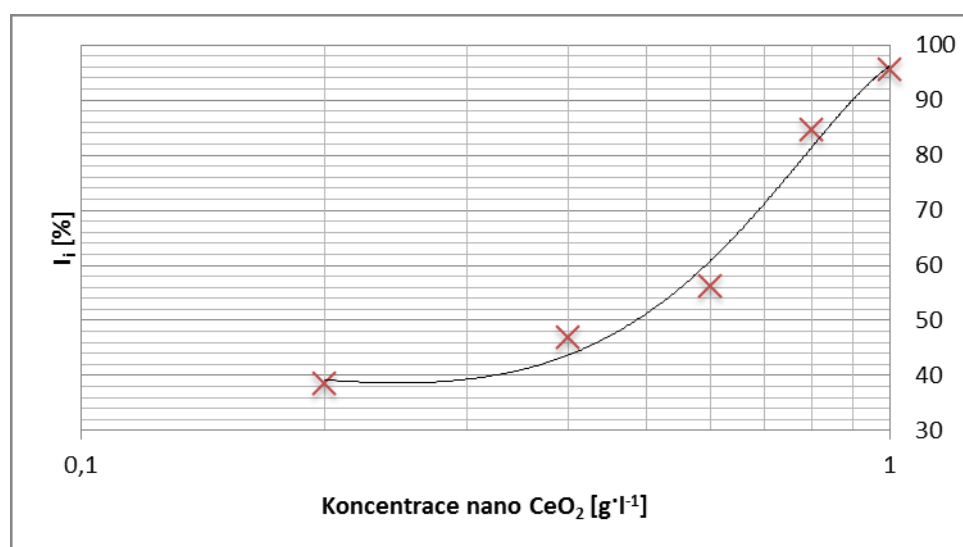
Tabulka 2: Tabulka naměřených hodnot pH a vodivosti.

Koncentrace nano CeO <sub>2</sub> [g·l <sup>-1</sup> ]	Číslo testu	pH (počátek testu)	pH (konec testu)	Rozdíl pH	Vodivost [μS·cm <sup>-1</sup> ]
<b>1</b>	1.	8,15	7,22	0,93	174,0
	2.	8,26	7,23	1,03	173,0
<b>0,8</b>	1.	8,25	7,22	1,03	167,0
	2.	8,22	7,25	0,97	167,8
<b>0,6</b>	1.	8,32	7,28	1,04	165,9
	2.	8,17	7,23	0,94	167,0
<b>0,4</b>	1.	8,22	7,24	0,98	164,3
	2.	8,47	7,33	1,14	163,8
<b>0,2</b>	1.	8,21	7,23	0,98	164,0
	2.	8,18	7,27	0,91	165,5

Ze získaných dat (Tabulka 3) byla stanovena experimentální hodnota parametru efektivní koncentrace toxicity EC<sub>50</sub>, která byla odečtena z křivky závislosti inhibice růstu biomasy v % na koncentraci vzorku v g·l<sup>-1</sup> (Obr. 9). Parametru EC<sub>50</sub> odpovídá koncentrace 0,49 g·l<sup>-1</sup> nanočástic oxidu ceričitého vůči řase *Desmodesmus subspicatus*.

Tabulka 3: Hodnoty inhibice růstu biomasy pro zvolené koncentrace nanočástic oxidu ceričitého.

Koncentrace nano CeO <sub>2</sub> [g·l <sup>-1</sup> ]	<i>I<sub>i</sub></i> [%]
1	95,41
0,8	84,48
0,6	56,24
0,4	46,80
0,2	38,45



Obr. 9: Křivka inhibice růstu biomasy pro nanočástice oxidu ceričitého.

## 5. Závěr

Nanočástice oxidu ceričitého byly připraveny precipitační metodou z vodného roztoku  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  o koncentraci  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , který byl za daných podmínek srážen hydroxidem amonným o koncentraci  $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Vzniklý světle žlutý prášek byl charakterizován práškovou rentgenovou difrakcí a skenovací elektronovou mikroskopií doprovázenou EDX analýzou. EDX analýza a rentgenová prášková difrakce potvrdila, že syntézou se podařilo připravit oxid ceričitý. Velikost krystalitů nanočástic oxidu ceričitého byla stanovena na 58 nm a z dat elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že během přípravy nanočástic došlo k jejich aglomeraci.

Touto jednoduše proveditelnou a nenáročnou metodou mohou být připravené nanočástice využity pro řadu aplikací, jak již v automobilovém průmyslu, tak i kosmetickém, hutním, sklo/keramickém apod. [4-7]. Proto v současnosti narůstající výroba a využití nanočástic oxidu ceričitého pro různé aplikace vyvolává obavy o jejich vliv na životní prostředí. V důsledku toho byla v bakalářské práci testována akutní akvatická toxicita připravených nanočástic oxidu ceričitého na sladkovodních zelených řasách *Desmodesmus subspicatus*. Bylo zjištěno, že 50 % inhibici růstu řasové kultury způsobí koncentrace 0,49 g nanočástic oxidu ceričitého na litr.

Z dosud publikovaných studií je patrná intenzita zkoumání toxicity nanočástic oxidu ceričitého, ale existuje nestejnorodost v dosažených výsledcích. Zvláště není mnoho studií toxicity nanočástic oxidu ceričitého vůči zeleným řasám *Desmodesmus subspicatus*. Toxicita nanočástic oxidu ceričitého na řasové kultuře *Desmodesmus subspicatus* již byla zkoumána v rámci jiné bakalářské práce zabývající se ekotoxicitou nanomateriálů [25], avšak bez jasných výsledků. Ve studii se nepodařilo určit faktor  $\text{EC}_{50}$  pro nanočástice oxidu ceričitého o velikosti 47,7 nm. Byl pouze stanoven faktor  $\text{EC}_{50}$  na hodnotu  $0,081 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  pro nanočástice oxidu ceričitého o velikosti 2,1 nm. Z důvodu odlišné velikosti částic není možné výsledky dosažené v této studii srovnávat s výsledky prezentovanými v předkládané bakalářské práci.

Nicméně některé studie dokazují, že se snižující se velikostí nanočástic, vzrůstá jejich toxicita. Následující faktory ovlivňující toxicitu nanočástic pak s jejich velikostí souvisí. Např. agregace nanočástic je ovlivněna iontovou silou, množstvím organických látek, koncentracemi daných látek, jejich hodnotou pH a teplotou. Dále na toxický účinek nanočástic má též vliv i způsob přípravy roztoku toxikantu, tzn. pouze míchání, sonifikace nebo přidavek dispergační látky. U fotosenzitivních látek může

mít vliv na míru toxicity i přítomnost osvětlení, jeho míra a druh světelných paprsků. Náležitý účinek na toxicitu mají i charakteristiky testovaných organismů [21].

Z výše uvedeného plyne, že nedílnou součástí hodnocení toxicity nanomateriálů je charakterizace jejich fyzikálně chemických vlastností, protože poznatky jsou důležité pro možnost srovnání jednotlivých studií. Dále jsou do budoucna důležité testy toxicity i na jiných detekčních organismech, než na zelených řasách, protože každý organismus reaguje odlišně na stejný toxikant. V neposlední řadě jsou důležité snahy propracovat hlouběji metodiku hodnocení toxicity nanomateriálů, která není v současné době dostačující ve srovnání s metodikou hodnocení toxicity konvenčních materiálů.

## Reference

- [1] BARABASZOVÁ, Karla. *Nanotechnologie a nanomateriály*. Ostrava: Tiskárna Schenk, 2006. ISBN 80-248-1210-X.
- [2] GÓMEZ-RIVERA, Francisco, James A. FIELD, Dustin BROWN a Reyes SIERRA-ALVAREZ. Fate of cerium dioxide (CeO<sub>2</sub>) nanoparticles in municipal wastewater during activated sludge treatment. *Bioresource Technology*. 2012, vol. 108, p. 300-304.
- [3] DOMÍNGUEZ, Alazne, Carolina ARISTIMUÑO, Eneritz ARRIAGA, Amaia ASPIAZU, Blanca SUÁREZ-MERINO a Felipe GOÑI-DE-CERIO. Acute and subchronic pulmonary toxicity of cerium oxide nanoparticles for safety assessment. *Toxicology Letters*. 2013, vol. 221, S239.
- [4] MANIER, Nicolas, Anne BADO-NILLES, Patrice DELALAIN, Olivier AGUERRE-CHARIOL, Pascal PANDARD. Ecotoxicity of non-aged and aged CeO<sub>2</sub> nanomaterials towards freshwater microalgae. *Environmental Pollution*. 2013, vol. 180, p. 63-70.
- [5] STEINER, Sandro, Loretta MUELLER, Olga B. POPOVICHEVA, David O. RAEMY, Jan CZERWINSKI, Pierre COMTE, Andreas MAYER, Peter GEHR, Barbara ROTHEN-RUTISHAUSER a Martin J. D. CLIFT. Cerium dioxide nanoparticles can interfere with the associated cellular mechanistic response to diesel exhaust exposure. *Toxicology Letters*. 2012, vol. 214, issue 2, p. 218-225.
- [6] CHENG, Guilin, Wei GUO, Lu HAN, Erlei CHEN, Lingfang KONG, Lili WANG, Wenchao AI, Naining SONG, Haishan LI, Huiming CHEN. Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells *via* oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways. *Toxicology in Vitro*. 2013, vol. 27, issue 3, p. 1082-1088.
- [7] SRINIVAS, A., P. JAGANMOHAN RAO, G. SELVAM, P. BALAKRISHNA MURTHY a P. NEELAKANTA REDDY. Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. *Toxicology Letters*. 2011, vol. 205, issue 2, p. 105-115.
- [8] GARCÍA, Ana, Roser ESPINOSA, Lucía DELGADO, Eudald CASALS, Edgar GONZÁLEZ, Víctor PUNTES, Carlos BARATA, Xavier FONT a Antoni



SÁNCHEZ. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. *Desalination*. 2011, vol. 269, issue 1-3, p. 136-141.

[9] LEŠKO, Juraj, Jan TRŽIL a Roman ŠTARHA. *Anorganická chemie*. I. vydání. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 1999. ISBN 80-7078-692-2.

[10] JURSIK, František. *Anorganická chemie kovů*. 1. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. ISBN 80-7080-504-8. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-80-7080-504-8/pages-pdf/01.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-504-8/pages-pdf/01.html).

[11] PROKEŠ, Jaroslav, František BARTONÍČEK, Martin BRANIŠ, Pavla POUČKOVÁ, Renáta ŠTABLOVÁ, Alexandra ŠTAMBERGOVÁ, Jarmila VEČERKOVÁ a Max WENKE. *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vydání. Praha: Galén - Karolinum, 2005. ISBN 80-7262-301-X.

[12] BUMAJDAD, Ali, Julian EASTOE and Asha MATHEW. Cerium oxide nanoparticles prepared in self-assembled systems. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2009, vol. 147-148, p. 56-66.

[13] JIAN-DONG, Hu, Li YONG-XIU, Zhou XUE-ZHEN a Cai MING-XIA. Preparation and characterization of ceria nanoparticles using crystalline hydrate cerium propionate as precursor. *Materials Letters*. 2007, vol. 61, issue 28, p. 4989-4992.

[14] ZAWADZKI, Mirosław. Preparation and characterization of ceria nanoparticles by microwave-assisted solvothermal process. *Journal of Alloys and Compounds*. 2008, vol. 454, issue 1-2, p. 347-351.

[15] DROBOT, D. V., A. V. CHUB, V. V. VORONOV, P. P. FEDOROV, V. K. IVANOV a POLEZHAEVA. Preparation of Ceria Nanoparticles. *Inorganic Materials*. 2008, vol. 44, issue 8, p. 853-855.

[16] GREIM, Helmut a Robert SNYDER. *Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction*. John Wiley & Sons, Ltd, 2008. ISBN 978-0-470-86893-5.

[17] HORÁK, Josef, Igor LINHART a Petr KLUSOŇ. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. 1. vydání. Praha: VŠCHT Praha, 2007. ISBN 978-80-7080-548-0.

[18] KOČÍ, Vladimír a Klára MOCOŮVÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. 1. vydání. Praha: VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-699-9.

[19] WILLIAMS, Phillip L., Robert C. JAMES a Stephen M. ROBERTS. *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*. John Wiley & Sons, Inc. 2000. ISBN 0-471-29321-0.

[20] PICKA, Karel a Jiří MATOUŠEK. *Základy obecné a speciální toxikologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně - fakulta chemická, 1996. ISBN 80-85368-91-9.

[21] SOVOVÁ, Tereza a Vladimír KOČÍ. Ekotoxikologie nanomateriálů. *Chemické Listy*. 2012, p. 82-87. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012\\_02\\_82-87.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_02_82-87.pdf).

[22] ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. 1. vydání. Liberec: Evernia s.r.o., 2011. ISBN 978-80-903787-9-7.

[23] HOECKE, Van K., J. T. K. QUIK, J. MANKIEWITZ-BOZCEK, K. A. C. SCHAMPHELAERE, A. ELSAESSER, P. MEEREN, C. BARNES, G. MCKERR, C. V. HOWARD, K. RYDZYŃSKI, K. A. DAWSON, A. SALVATI, A. LESNIAK, I. LYNCH, G. SILVERSMIT, L. VINCZE a C. R. JANSSEN. Fate and effects of CeO<sub>2</sub> nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests. *Environmental science technology*. 2009, issue 43.

[24] JOHNSTON, B. D., T. M. SCOWN, J. MOGER, S. A. CUMBERLAND, M. BAALOUSHA, K. LINGE, Van R. AERLE, K. JARVIS, J. R. LEAD a C. R. TYLER. Bioavailability of nanoscale metal oxides TiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub>, and ZnO to Fish. *Environmental Science Technology*. 2009, issue. 44.

[25] VILTOVÁ, Nad'a. *Ekotoxicita nanomateriálů*. Praha, 2011. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/73327/?lang=cs>. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Doc., Ing. Vladimír Kočí, Ph.D.

[26] BANDYOPADHYAY, Susmita, Jose R. PERALTA-VIDEA, Germán PLASCENCIA-VILLA, Miguel JOSÉ-YACAMÁN, Jorge L. GARDEA-TORRESDEY. Comparative toxicity assessment of CeO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles towards *Sinorhizobium meliloti*, a symbiotic alfalfa associated bacterium: Use of

advanced microscopic and spectroscopic techniques. *Journal of Hazardous Materials*. 2012, vol. 241–242, p. 379-386.

[27] KRISHNAMOORTHY, Karthikeyan, Murugan VEERAPANDIAN, Ling-He ZHANG, Kyusik YUN a Sang Jae KIM. Surface chemistry of cerium oxide nanocubes: Toxicity against pathogenic bacteria and their mechanistic study. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2013. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X13006758>.

[28] GARCÍA-SAUCEDO, Citlali, James A. FIELD, Lila OTERO-GONZALEZ a Reyes SIERRA-ÁLVAREZ. Low toxicity of HfO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CeO<sub>2</sub> nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hazardous Materials*. 2011, vol. 192, issue 3, p. 1572-1579.

[29] HASSAN, M. Shamshi, Touseef AMNA, Salem S. AL-DEYAB, Hyun-Chel KIM, Tae-Hwan OH a Myung-Seob KHIL. Toxicity of Ce<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> composite nanofibers against *S. aureus* and *S. typhimurium*: A novel electrospun material for disinfection of food pathogens. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012, vol. 415, p. 268-273.

[30] CHEN, Yong, Lisong YANG, Chao FENG a Long-Ping WEN. Nano neodymium oxide induces massive vacuolization and autophagic cell death in non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, vol. 337, issue 1, p. 52-60.

[31] PATRA, Chitta Ranjan, Soha S. Abdel MONEIM, Enfeng WANG, Shamit DUTTA, Sujata PATRA, Michal ESHED, Priyabrata MUKHERJEE, Aharon GEDANKEN, Vijay H. SHAH a Debabrata MUKHOPADHYAY. *In vivo* toxicity studies of europium hydroxide nanorods in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009, vol. 240, issue 1, p. 88-98.

[32] PALEČEK, Jaroslav a Jiří PALATÝ. *Toxikologie, hygiena a bezpečnost práce v chemii*. I. vydání. Praha: VŠCHT Praha v Čs. redakci VN MON, 1989. ISBN 80-7080-018-6.

[33] TICHÝ, Miloň. *Toxikologie pro chemiky: Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*. 1. vydání. Praha: Karolinum - nakladatelství Univerzity Karlovy, 1998. ISBN 80-7184-625-2.

[34] SCHERRER, P.. Estimation of the previous and internal structure of colloidal particles by means of roentgen rays. *Nach Ges Wiss Gottingen*. 1918, p. 96-100.

[35] Český normalizační institut. Jakost vod – zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. *Česká technická norma ISO 8692: 2004*, 2005.

[36] Alga, growth inhibition test 201; organization for economic cooperation and development; oecd guidelines for testing chemicals 201, 1984.

[37] Profil Taxonu. *BioLib*. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id813712/>.

[38] PROCHÁZKOVÁ, Michaela. Desmodesmus sp. Sinice a řasy: *Fykologická laboratoř na katedře botaniky Přírodovědecké fakulty JU v Českých Budějovicích*. 2003. Dostupné z: [http://galerie.sinicearasy.cz/galerie/chlorophyta/chlorophyceae/kokalni-coccoids/desmodesmus?image\\_id=9513](http://galerie.sinicearasy.cz/galerie/chlorophyta/chlorophyceae/kokalni-coccoids/desmodesmus?image_id=9513).